

PROPRIETA' PRO-APOPTOTICHE DI EUPLOTINA C, UN METABOLITA SECONDARIO ISOLATO DAL CILIATO MARINO EUPLOTES CRASSUS: MECCANISMI MOLECOLARI.

RAZIONALE

L'apoptosi è un vero e proprio programma di morte potenzialmente presente in tutte le cellule, codificato a livello del loro genoma, che determina l'eliminazione controllata di alcune cellule per salvaguardare la sopravvivenza dell'organismo nel suo complesso. L'innescò del processo apoptotico può essere mediato da numerosi stimoli, e può avvenire secondo meccanismi diversi, a seconda del tipo di cellula coinvolta, che sembrano comunque convergere verso una sequenza di eventi altamente conservata. La concentrazione di Ca^{2+} intracellulare ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sembra rivestire un ruolo cruciale nel processo apoptotico. In particolare, la fase di innescò è seguita da una fase esecutrice in cui la cellula va incontro a diversi cambiamenti biochimici che culminano con l'attivazione di enzimi catabolici (proteasi e nucleasi) che tagliano proteine e DNA. In una morte cellulare per apoptosi si devono riscontrare condensazione nucleare, frammentazione del nucleo, taglio del DNA in frammenti internucleosomali e formazione di corpi apoptotici senza rottura della membrana plasmatica. Un ruolo principale è giocato dalle caspasi (cistein-proteasi). Infatti, dopo attivazione delle caspasi iniziatrici si attivano, con un segnale a cascata, le caspasi esecutrici che tagliano proteine critiche per la sopravvivenza cellulare inducendo così la morte della cellula. Attualmente sono stati identificati diversi meccanismi di apoptosi che possono comunicare e interscambiare alcuni componenti e che possono o meno essere associati all'attivazione delle caspasi.

Molti agenti farmacologici già in uso nella terapia contro i tumori ed alcuni potenziali agenti antitumorali attualmente in fase di sperimentazione, sono composti ad azione citotossica/pro-apoptotica che derivano da piante, animali, organismi marini e microrganismi. La ricerca sui composti naturali ha dimostrato che spesso funzionano come "armi chimiche" evolute in quanto potenti inibitori di processi cellulari nelle prede, nei predatori, nei parassiti o nei competitori degli organismi che li producono. I sesquiterpeni, in particolare, sono una classe di molecole che hanno dimostrato un potenziale terapeutico nella riduzione della progressione tumorale. Si tratta di isoprenoidi a 15 atomi di carbonio presenti tipicamente nelle piante e negli organismi marini. L'aldeide sesquiterpenica euplotina C, uno dei metaboliti secondari prodotti dal protozoo ciliato marino *Euplotes Crassus*, ha una notevole attività biologica in quanto uccide i ceppi di *Euplotes* non produttori di euplotine, mentre a dosi sub-letali altera il ciclo cellulare, la motilità cellulare e la forma cellulare. Studi precedenti, condotti dal gruppo di ricerca della Prof. Bagnoli (Dip. di

Biologia-Unità di Fisiologia Generale) su cellule tumorali AtT-20 (corticotrope di topo) e PC12 (cromaffini di ratto) hanno dimostrato l'effetto citotossico dell'euplotina C a concentrazioni micromolari e la sua capacità di indurre morte cellulare per apoptosi. In particolare, l'apoptosi si manifesta dopo le 6 h di trattamento. Inoltre, l'euplotina C induce un rapido e sostenuto aumento della $[Ca^{2+}]_i$ attraverso la deplezione di Ca^{2+} dai compartimenti del reticolo endoplasmatico (RER). In particolare, l'euplotina C determina l'apertura dei canali al Ca^{2+} rianodinici presenti sulla membrana del RER.

Questa tesi ha lo scopo di indagare ulteriormente i meccanismi molecolari che mediano l'effetto apoptotico dell'euplotina C. Infatti, la valutazione delle potenzialità terapeutiche di un composto naturale si basa, oltre che sullo studio del tipo di attività biologica, anche sulla comprensione dei meccanismi biochimici che ne regolano l'azione. In questa ottica, la conoscenza dei meccanismi di traduzione del segnale apoptotico mediato dall'euplotina C nelle cellule tumorali rappresenta un passaggio essenziale.

RISULTATI

Nelle cellule PC12, è stato valutato l'effetto dell'euplotina C su i) una serie di fattori pro- e anti-apoptotici tipicamente coinvolti nei processi di morte cellulare e, ii) su enzimi effettori quali le calpaine (proteasi calcio-dipendenti) e le caspasi. Infine è stato studiato anche l'effetto dell'euplotina C sull'induzione di stress ossidativo.

Misure di vitalità cellulare (test MTT) dopo applicazione di euplotina C in presenza o meno di rianodina, uno specifico bloccante dei canali rianodinici, hanno dimostrato che la rianodina è in grado di inibire, almeno in parte, l'azione citotossica del sesquiterpene, suggerendo l'importanza fondamentale del Ca^{2+} come mediatore dell'apoptosi indotta da euplotina C. La deplezione di Ca^{2+} dal RER può indurre il cosiddetto "stress del reticolo". La proteina chaperone Bip/GRP78 è comunemente usata come indicatore di stress. Mediante tecnica di Western blot abbiamo dimostrato che l'espressione di tale proteina aumenta in presenza di euplotina C a partire da 1 h di trattamento fino ad un massimo dopo 6 h. Oltre al RER anche altri organuli intracellulari, tra cui i mitocondri, costituiscono importanti sedi di integrazione tra la fase di induzione apoptotica e l'attivazione delle caspasi (fase di esecuzione). Fattori pro-apoptotici come Bax, una volta traslocati dal citosol alla membrana mitocondriale determinano la formazione di megapori inducendo la caduta del potenziale mitocondriale e la fuoriuscita di fattori necessari per il prosieguo della cascata apoptotica, tra cui il citocromo c. Al contrario fattori anti-apoptotici come Bcl-2 garantiscono l'integrità della membrana mitocondriale e sono in grado di sequestrare e silenziare fattori pro-apoptotici. Mediante PCR semiquantitativa abbiamo dimostrato che l'espressione dell'mRNA di

Bax aumenta dopo 1-3 h di trattamento con euplotina C, per poi tornare a valori basali dopo 6 h dal trattamento. Al contrario l'espressione dell'mRNA di Bcl-2 diminuisce progressivamente a partire da 1 h di trattamento con euplotina C. Questi risultati sono stati confermati in maniera speculare dallo studio dell'espressione delle proteine Bax e Bcl-2 tramite Western blot. Con la stessa tecnica abbiamo dimostrato che l'espressione del citocromo c aumenta dopo applicazione di euplotina C a partire da 1 h di trattamento. In particolare, l'incremento del citocromo c si verifica in estratti citosolici privi di mitocondri suggerendo che tale proteina viene indotta dall'euplotina C a traslocare dal lume mitocondriale al citosol.

Abbiamo quindi spostato la nostra attenzione sulla fase di esecuzione del programma apoptotico, studiando l'effetto di euplotina C su alcuni importanti effettori implicati nel processo di morte cellulare. La procaspasi-12, è una proteina localizzata sul versante citoplasmatico della membrana del RER che in seguito ad un prolungato "stress del reticolo" ed alla mobilitazione del Ca^{2+} dal RER viene attivata a caspasi-12. Esperimenti di Western blot hanno dimostrato che solo tempi di incubazione prolungati delle cellule con l'euplotina C (6 h) causano una diminuzione dei livelli di procaspasi-12, suggerendo che l'attivazione della caspasi-12 interviene solo in seguito ad una esposizione prolungata delle cellule all'euplotina C. L'attività della caspasi-3, una delle principali caspasi esecutrici del programma di morte cellulare, spesso utilizzata come marker apoptotico, è stata determinata mediante un test colorimetrico condotto su cellule trattate a diversi tempi con l'euplotina C. Dopo 3-6 h di trattamento con l'euplotina C si verifica un incremento dell'attività della caspasi-3, suggerendo il coinvolgimento di tale enzima nel processo apoptotico indotto da euplotina C. Anche le proteasi della famiglia delle calpaine possono essere implicate nella fase di esecuzione dell'apoptosi e possono essere attivate in seguito ad un aumento massivo della $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nel nostro studio, l'espressione dell'mRNA della calpaina e la sua attività enzimatica sono state valutate in cellule trattate con euplotina C mediante PCR semiquantitativa e dosaggio enzimatico fluorescente. L'espressione dell'mRNA della calpaina aumenta dopo 1-3 h di trattamento con euplotina C, per poi tornare a valori basali dopo 6 h dal trattamento. Anche l'attività della calpaina risulta incrementata dopo 1 h di applicazione di euplotina C per poi tornare a livelli basali dopo 3-6 h di trattamento. Per sostenere l'importanza dell'attività della calpaina nel processo di apoptosi indotto dall'euplotina C, la vitalità delle cellule è stata misurata con il test MTT in assenza o in presenza di uno specifico inibitore delle calpaine. I risultati dimostrano che l'applicazione dell'inibitore delle calpaine induce morte cellulare in assenza di euplotina C suggerendo che le calpaine attivate in condizioni di Ca^{2+} basale hanno un ruolo importante per la sopravvivenza cellulare. D'altra parte, l'applicazione dell'inibitore delle calpaine sembra potenziare l'efficacia citotossica dell'euplotina C. Per spiegare questo risultato possiamo speculare che l'attivazione delle

calpaine da parte di euplotina C possa svolgere un ruolo di feedback negativo che limita l'azione citotossica del sesquiterpene. Tuttavia, la verifica di questa ipotesi ha bisogno di ulteriore approfondimento.

Lo stress ossidativo è un processo che avviene all'interno delle cellule in seguito ad una massiccia produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e può essere indotto da insulti tossici subiti dalla cellula. Lo stress ossidativo può essere un'importante componente dei meccanismi apoptotici. Esperimenti condotti tramite test MTT dopo applicazione di euplotina C in presenza o meno di uno specifico inibitore di ROS hanno dimostrato che gli effetti citotossici di euplotina C sono ridotti, almeno in parte, in presenza dell'inibitore, suggerendo che la generazione di ROS è un meccanismo del processo apoptotico indotto dall'euplotina C. Tale ipotesi è stata verificata ulteriormente misurando la generazione di ROS con un dosaggio fluorescente. Infatti, l'applicazione dell'euplotina C causa un rapido aumento della generazione di ROS; tale aumento è lineare e progressivo, con un massimo dopo 3 h dall'applicazione di euplotina C. Al fine di stabilire se Ca^{2+} de generazione di ROS agiscono in concomitanza od in maniera indipendente nel processo apoptotico indotto da euplotina C, sono state effettuate misure della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con tecnica spettrofluorimetrica. In particolare, abbiamo dimostrato che l'incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indotta da euplotina C è significativamente ridotta in presenza dell'inibitore di ROS. Questi risultati suggeriscono che la deplezione del Ca^{2+} dal RER indotta da euplotina C è in qualche modo facilitata dall'induzione di stress ossidativo all'interno delle cellule, suggerendo una sorta di interazione tra vie di trasduzione Ca^{2+} -dipendenti e stress ossidativo.